

氏名	たかはし ひでかず 高橋 秀和	
学位の種類	博士(医学)	
学位授与年月日	平成27年3月25日	
学位授与の条件	学位規則第4条第1項	
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程)	医科学専攻
学位論文題目	<i>BRAF</i> 遺伝子変異型大腸癌においてがん抑制的 microRNA として機能する microRNA-193a-3p に関する研究	
論文審査委員	主査 教授 石岡 千加史 教授 森 隆弘 教授 伊藤 潔	

論文内容要旨

背景：

大腸癌の発生・進展過程において、遺伝子変異や染色体転座などのジェネティックな異常や CpG アイランドメチレーター表現型などのエピジェネティックな異常が段階的に起こる。ジェネティックな異常の1つである *BRAF* 遺伝子変異(以下、*BRAF* 変異)は、大腸癌全体の約10%に認められる。変異型 *BRAF* 遺伝子を持つ大腸癌(以下、*BRAF* 変異型大腸癌)はそれ以外の大腸癌と比較し生命予後が悪く臨床的に異なった特徴を有し、*BRAF* 変異型大腸癌に対して効果的な治療戦略が求められるが、*BRAF* 変異型大腸癌の臨床的特徴を説明し、治療標的の探索を可能にする分子機序は未だ不明である。一方、microRNA(miRNA)は20から25塩基の non-coding RNA であり、主に標的分子の転写後制御に作用することにより、様々な細胞内の機能を制御する。多くの癌種で miRNA の機能異常が発癌に寄与する可能性が示唆されているが、*BRAF* 変異型大腸癌の発癌・進展過程に miRNA の機能異常がどのような役割を果たしているかは不明である。

目的：

本研究の目的は、*BRAF* 変異型大腸癌に特異的な miRNA の発現異常を同定し、その miRNA が *BRAF* 変異型大腸癌の発癌・進展に促進的、または抑制的に作用するメカニズムを明らかにすること、ならびに大腸癌の腫瘍内の miRNA の発現量と、抗癌剤感受性との関連を明らかにすることである。

方法：

手術療法またはがん薬物療法、もしくはその両方の治療を受けた大腸癌314例を対象とした。この314例からスクリーニングセット(*BRAF* 変異型大腸癌15例、野生型 *KRAS* 遺伝子かつ野生型 *BRAF* 遺伝子を持つ大腸癌15例)と検証セット(*BRAF* 変異型大腸癌4例、野生型 *KRAS* 遺伝子かつ野生型 *BRAF* 遺伝子を持つ大腸癌30例)を抽出した。スクリーニングセットを用いて miRNA マイクロアレイによる網羅的 miRNA 発現解析を行い、野生型 *KRAS* 遺伝子かつ野生型 *BRAF* 遺伝子を持つ大腸癌群と比較し、*BRAF* 変異型大腸癌群で発現量が変化している miRNA を同定した。次に検証セットを用いてリアルタイム RT-PCR 法により miRNA 発現量を定量し、スクリーニングセットによる網羅的 miRNA 発現解析の結果の再現性を検証した。さらに、大腸癌細胞株に *BRAF* 変異型大腸癌群で発現低下が見られた miR-193a-3p を過剰発現させて細胞増殖能、浸潤能に与える変化をそれぞれ MTT アッセイ、浸潤アッセイにより評価した。変異型 *BRAF* (p. V600E) 発現プラスミドを作成し、大腸癌細胞株に変異型 (V600E) *BRAF* を過剰発現した際の miR-193a-3p の発現量の変化をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。さらにがん薬物療法を受けた大腸癌99例において、miR-193a-3p の発現量と初回化学療法開始後の全生存期間、抗 EGFR 抗体薬開始後の全生存期間、初回化学療法あるいは抗 EGFR 抗体薬の無増悪生存期間、奏効率、腫瘍制御率の間に関連があるかどうかを解析した。

結果：

スクリーニングセットを用いた miRNA マイクロアレイによる網羅的 miRNA 発現解析により、野生

型 *KRAS* 遺伝子かつ野生型 *BRAF* 遺伝子を持つ大腸癌群と比較して *BRAF* 変異型大腸癌群で高発現の miRNA を 9 種類、低発現の miRNA を 13 種類同定した。これらの 22 種類の miRNA のうち、*BRAF* 変異型大腸癌群で高発現の上位 3 種類 (miR-31、miR-135b、miR-7) と低発現の下位 2 種類 (miR-193a-3p、miR-148b) について、検証セットを用いてリアルタイム RT-PCR 法で再現性を検証したところ、miR-31、miR-135b、miR-193a-3p の 3 種類がスクリーニングセットと同様に *BRAF* 変異型大腸癌群で有意に発現が変化していることが確認された。これら 3 種類の miRNA のうち miR-193a-3p が大腸癌細胞株の細胞増殖能や浸潤能を阻害する作用を有することが明らかになり、発癌過程で抑制的 miRNA として機能する可能性が示唆された。さらに *KRAS* 遺伝子と *BRAF* 遺伝子が共に野生型の大腸癌細胞株に変異型 (V600E) *BRAF* を過剰発現させたところ、miR-193a-3p の発現低下が誘導されたことから、miR-193a-3p は *BRAF* あるいはさらにその下流の MEK-ERK-MAPK 経路関連因子によって直接的または間接的に負の制御を受けている可能性が示唆された。最後に、進行再発大腸癌症例において miR-193a-3p の低発現群はその高発現群と比較して、抗 EGFR 抗体薬に対する無増悪生存期間が短いことを明らかにした。このことから miR-193a-3p が抗 EGFR 抗体薬治療の感受性に関与している可能性が示唆された。

結語：

本研究において、*BRAF* 変異型大腸癌で特異的に発現が変化する miRNA の一つとして miR-193a-3p を同定した。miR-193a-3p は発癌過程で抑制的な機能を有する可能性を示した。また、miR-193a-3p の発現量が抗 EGFR 抗体薬治療による効果と関連する可能性を示した。miR-193a-3p が大腸癌の発生・進展に関わる機序を解明することにより、*BRAF* 変異型大腸癌に特異的な新規標的分子が同定される可能性があり、*BRAF* 変異型大腸癌の診断法や治療法のさらなる発展につながることを期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 BRAF 遺伝子変異大腸癌において癌抑制的 microRNA として機能する
microRNA-193a-3p に関する研究

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 臨床腫瘍学 分野

氏名 高橋 秀和

申請者は、大腸癌全体の約 10%を占める BRAF 遺伝子変異（以下、BRAF 変異）陽性大腸癌が、予後不良で抗がん剤治療抵抗性であることに着目し、microRNA（miRNA）の発現を調べることに
より、BRAF 変異陽性大腸癌に特異的な miRNA の発現異常を同定し、さらに、その miRNA が BRAF 変異型大腸癌の発癌・進展に促進的、または抑制的に作用するメカニズムを明らかにすること、ならびに大腸癌の腫瘍内の miRNA の発現量と、抗癌剤感受性との関連を明らかにすることを目的にした研究を行った。

その結果、miRNA マイクロアレイによる網羅的 miRNA 発現解析により、野生型 KRAS 遺伝子かつ野生型 BRAF 遺伝子を持つ大腸癌群と比較して BRAF 変異型大腸癌群で高発現の miRNA を 9 種類、低発現の miRNA を 13 種類同定した。これらの 22 種類の miRNA のうち、BRAF 変異型大腸癌群で高発現の上位 3 種類（miR-31、miR-135b、miR-7）と低発現の下位 2 種類（miR-193a-3p、miR-148b）について、リアルタイム RT-PCR 法で再現性を検証したところ、miR-31、miR-135b、miR-193a-3p の 3 種類がスクリーニングセットと同様に BRAF 変異型大腸癌群で有意に発現が変化していることを確認した。また、これら 3 種類の miRNA のうち miR-193a-3p が大腸癌細胞株の細胞増殖能や浸潤能を阻害する作用を有することを明らかにした。このことから、発癌過程で抑制的 miRNA として機能する可能性を指摘した。さらに KRAS 遺伝子と BRAF 遺伝子が共に野生型の大腸癌細胞株に変異型（V600E）BRAF を過剰発現させたところ、miR-193a-3p の発現低下が誘導されたことから、miR-193a-3p は BRAF あるいはさらにその下流の MEK-ERK-MAPK 経路関連因子によって直接的または間接的に負の制御を受けている可能性を指摘した。最後に、進行再発大腸癌症例において miR-193a-3p の低発現群はその高発現群と比較して、抗 EGFR 抗体薬に対する無増悪生存期間が短いことを明らかにした上で、miR-193a-3p が抗 EGFR 抗体薬治療の感受性に関与している可能性を指摘した。本研究により、miR-193a-3p が大腸癌の発生・進展に関わる機序を解明することにより、BRAF 変異型大腸癌に特異的な新規標的分子が同定される可能性があり、BRAF 変異型大腸癌の診断法や治療法のさらなる発展につながることを期待される。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。